云 南 植 物 研 究 8（2）：141—146，1986
Acta Botanica Ynnnanica

云南松小孢子发生的超微结构研究*

刘成运　　　　李 颂 徐维明 李 鸣
（中国科学院昆明植物研究所）　　（中国医学科学院医学生物学研究所）

摘要 云南松（*Pinus yunnanensis* Fr.）小孢子囊发育早期，原生质体发生收缩、同时形成胼胝质壁。小孢子母细胞减数分裂前互相分离，并被胼胝质壁包围。在壁上有约0.2微米的小孔。四分体小孢子形成后，核被膜及高尔基体显得非常地活跃，他们可能与外壁的沉积有关。这个现象在早期四分体阶段出现。内壁的形成是在自由小孢子时期，开始高尔基体和核被膜仍较活跃，但随之下降。内质网和线粒体增多，许多来自内质网的泡囊通过质膜被排放到内壁中去。乌氏体与花粉外壁之间观察到了孢粉素带。

关键词 云南松；超微结构；小孢子发生

关于裸子植物小孢子发生过程的超微研究工作，在松科中有 *Pinus banksiana*，*Pinus silvestris* 及 *Larix sibirica* 已报道过[4、5、11、12]。在其他科中对 *Podocarpus macrophyllus*，*Taxus baccata* 及 *Ginkgo biloba* 等进行过报道[8、9]。这些研究对小孢子囊发育早期小孢子母细胞、绒毡层细胞的结构变化以及外壁的形成过程中细胞核膜和细胞器的变化作了较深入的观察。本文对我国松属亚热带类型的云南松小孢子发生过程中超微结构的变化进行了研究。

材 料 和 方 法

云南松（*Pinus yunnanensis* Fr.）样品采自昆明植物研究所树木园内。自1983年11月至12月和1984年3月分别采集小孢子叶球，将小孢子叶分散后固定于3％戊二醛内（用0.05M二甲胂酸钠缓冲液 pH 7.2配制）。抽气1小时，室温放置4小时后，用上述缓冲液洗涤三次，每次30分钟。后固定于用上述缓冲液配制的2％锇酸内，置冰箱内过夜，用重蒸馏水洗三次，每次30分钟，丙酮系列脱水，环氧丙烷过渡，EPON 812包埋，置37、45、62°C各12小时聚合。LKB Ⅴ型超薄切片机，金刚刀切片。柠檬酸铅及醋酸双氧铀双重染色。DXB_2-12型电子显微镜下观察并摄影。

本文于1985年8月16日收到。
* 本研究承蒙王伏雄教授指导，特致以衷心感谢。

结 果

云南松小孢子囊个体发生早期，在当年11月至12月，造孢组织细胞已经有丝分裂，形成许多小孢子母细胞[1]。最早期的小孢子母细胞细胞之间紧密，在细胞壁上可观察到孢间连丝，使细胞之间互相沟通。细胞核较大，细胞质中主要细胞器是高尔基体、线粒体、内质网、核糖体和不含淀粉粒的质体（图版Ⅰ，1）。高尔基体分泌的小泡囊向细胞四周质膜处转移，很可能为小孢子母细胞进一步发育时形成胼胝质外壁提供材料。当小孢子母细胞将进入减数分裂期之前，小孢子母细胞首先形成胼胝质的细胞壁，此时周围绒毡层细胞也同时形成胼胝质壁，而且它们最明显的改变是发生原生质体的收缩现象，质膜与胼胝质壁之间出现空隙（图版Ⅰ，2）。而在这个时期，高尔基体数量减少，线粒体和内质网以及含淀粉粒的质体数量增加。一月下旬至二月初，小孢子母细胞之间中层分解，细胞之间互相分离，每一小孢子母细胞被包围在胼胝质壁内，此后就进入了减数分裂期。从一个进入减数分裂中期Ⅰ的图片中，可以观察到在周围胼胝质壁上有一小孔（图版Ⅰ，3）。孔的直径约0.2至0.3微米，这显然是与周围环境进行物质交换的通道，但孔径很小、不像在其他植物中被观察到的有1至2微米[10]。细胞中部赤道板部位是一些染色体，而纺锤体呈纺锤状，两端向两极集中。细胞四周除含淀粉粒的质体比较明显可见外，其余绝大部分为许多大小不等的泡囊所占据，在放大的图片中，可以观察到这些泡囊是由高尔基体所分泌，由于潴泡高度扩大，以致中央板状区不明显（图版1，4）。二月初，小孢子母细胞减数分裂结束，四分体小孢子形成。四分体小孢子为四面体形。早期的四分体小孢子之间互相被胼胝质壁所分隔，使互不相通。细胞最显著的形态变化是细胞核被膜及高尔基体显得非常地活跃。细胞核四周呈现高度的曲折。核被膜膨胀或外凸形成一些泡囊，而高尔基体的潴泡更是高度扩大，中央板状区几乎全部被覆盖，使高尔基体外形很不典型，这是分泌功能非常活跃的一种形态表现。大量的泡囊向四周质膜处转移，并汇聚成较大的泡囊区（图版Ⅱ，5、6箭头所示及星号所示）。四分体进一步地发育是质膜外围公共胼胝质壁之间形成最初的外壁以及由外壁衍变而来的最初气囊(图版Ⅱ，7、8箭头所示)。值得注意的是外壁内侧是与小孢子本身质膜发生联系，而外围部分，包括气囊是与胼胝质公共壁发生联系，互相有通道相沟通。因此，外壁的外层是孢外来源，而内层是孢内起源。这种最早期外壁可能是纤维素质，故又被称做纤维素原外壁。进一步地发育是外壁的被层或称覆盖层及原棒或称原基粒棒的形成，它们的组成是脂蛋白和原孢粉素物质[3、6]。在云南松中，这一具体形成过程未观察到。当四分体小孢子外壁形成初期，周围绒毡层细胞胼胝质向药内壁及垂周壁开始出现解体，一些前乌氏体通过质膜进入解体中的细胞壁内或进入药室，同时孢粉素物质迅速在外围沉积，形成乌氏体（图版Ⅱ，8）。当四分体还被公共胼胝质壁包围着时，外壁外层，包括覆盖层，原基粒棒以及内层的片层状结构均已经形成（图版Ⅱ，9）。二月中旬，单核小孢子从解体的公共胼胝质壁内释放到药室内成为分散的小孢子，外壁开始接受来自绒毡层的孢粉素物质及其它外膜镶嵌物质（图版Ⅲ，10）。当游离小孢子出现后，纤维素性质的内壁也开始沉积，在沉积的早期，小孢子细胞核被膜及高尔基体仍然

是比较活跃的（图版Ⅲ,10、11）。而在内壁形成的后期，内质网和线粒体的数量增加，在内壁与质膜交界处，有许多由内质网槽库扩大形成的小囊泡，通过质膜向内壁排放（图版Ⅲ,12、13），而细胞核的核被膜已恢复到接近静止状态，高尔基体已不明显。二月底绒毡层细胞解体，大量乌氏体及其它绒毡层物质进入药室，并向花粉粒外壁上沉积。在乌氏体向花粉粒表面沉积时，还观察到孢粉素物质向外壁过渡的"桥"状孢粉素带（图版Ⅲ，14、15）。此时花粉外壁迅速增厚，单核花粉粒于二月底形成。三月初四细胞花粉成熟，并飞散传粉[1]。

讨　　论

1.小孢子囊发育早期，原生质体发生收缩现象，这可能是针叶树中一个较普遍的现象[5]。在已报道的文献中，*Pinus banksiana*, *Pinus silvestris* 以及 *Podocarpus macrophyllus* 等都发生这一现象。这些作者认为直接的原因是由于多糖物质从细胞内到细胞壁之间进行转移，使细胞壁厚度增加，另外可能是半纤维素高度的吸湿性，由于水分的吸收而广泛的膨胀，而在原生质体收缩的同时，伴随着小孢子囊总体积的突然扩大[4、9、11]。

2.小孢子母细胞在进入减数分裂前，细胞四周被胼胝质壁包围，同时细胞壁之间中层解体，使每一小孢子母细胞互相分离，这样事实上每一小孢子母细胞均处于孤立化状态，这种孤立有着重要的生理学和遗传学意义。Kapil等认为这是减数分裂的先决条件，也是后来四个减数孢子自发地转变为小孢子的前提[7]。胼胝质包围着四分体，其功能如同"分子筛"，控制着细胞间物质交流，以此保持通过基因重组与分离后遗传上多少有所不同的小孢子之间的独立性[2]。但小孢子并非与外界绝无一点联系。在云南松进行减数分裂的小孢子母细胞胼胝质壁上，可以观察到直经约0.2至0.3微米的小洞，这些通道使小孢子母细胞与周围构成了胞质联络的场地。这一现象与 Whelan (1974)[10]用相差显微镜在被子植物中所观察到的直径约 1 — 2 微米的较宽的通道有某些共同之处。一些作者认为这是造成减数分裂同步的原因[2]。但云南松小孢子母细胞之间的通道是狭窄的，也许只允许某些小分子物质进行交换。而云南松的同一小孢子囊内小孢子母细胞之间的减数分裂是不同步的[1]。

3.当四分体小孢子形成的早期，每个小孢子的细胞核被膜及高尔基体显得非常地活跃，这种超微变化，在红豆杉 *Taxus baccata* 及银杏 *Ginkgo biloba* 的小孢子发育的早期也被观察到[8]。作者认为这二个属的外壁沉积过程中，核膜及高尔基体分泌物通过质膜向外部片层状内层转移，因此内层的发生是来自小孢子本身，而外层则是来源于孢外的胼胝质壁，即由孢外起源。Heslop-Harrison 以及Dickinsin (1968)[3、6]在被子植物 *Lilium longiflorum* 和 *Silene pendula* 的细胞壁发育研究中，指出在四分体小孢子时期，最初的外壁外层，包括被层和原棒是来自小孢子外围的公共胼胝质壁，而内层 1 及 2 是由小孢子所积累。在云南松四分体小孢子时期，小孢子四周外壁的外围与胼胝质壁互相沟通，而内侧则与质膜及高尔基体和核被膜所产生的许多小泡相接触，这也反映了它们的外层和内层的来源是不同的，但未观察到象在红豆杉四分体小孢子时期

胼胝质壁内有许多电子致密的孢粉素小球向外层沉降的过程[8]。无论被子植物还是裸子植物，他们的外壁是在胼胝质包围着的四分体小孢子时期就已合成了[2]，这看来都是一致的。

4.当四分体小孢子的胼胝质壁解体，单核小孢子分散在药室内，每一小孢子的外壁及其衍生的气囊开始接受来自绒毡层的解体物质，这些物质包括由乌氏体携带的孢粉素，其它类脂，类胡萝卜素及一些识别蛋白质等，它们沉积，聚合或镶嵌在外壁的外膜上，使外壁迅速地增厚[5、6]。在游离小孢子时期，开始沉积纤维素性质的内壁，在内壁形成的早期，小孢子细胞核被膜及高尔基体仍然比较活跃，而在沉积的后期，核膜已恢复到正常静止细胞核的外形，表面不再产生曲折和外排活动，高尔基体数量减少，而内质网及线粒体数量增加，内质网槽库扩大，形成许多小的液泡通过众多的线粒体之间逐渐被转移到质膜附近，并通过质膜被排放到内壁中去。因此，内壁的形成过程中内质网、线粒体（可能起着能量供应者的作用）所表现的活动比较明显，而高尔基体和核被膜在外壁内层的形成过程中表现的较为明显。云南松内壁的形成过程表现出与Heslop-Harrison[6]在被子植物中所观察到的有些相似。当小孢子接受来自乌氏体释放的孢粉素过程中，观察到乌氏体到外壁之间的孢粉素带，Banerjee以及Barghoorn（1971）在某些禾本本科植物花药中也观察到了这种孢粉素带成为连接二者的桥，他们认为这是由于孢粉素小分子在运输途中被固定剂固定而造成的，正好作为从绒毡层转移孢粉素建造花粉外壁的证据[2]。

参 考 文 献

〔1〕 刘成运，1985：云南植物研究，7（2）：210—216。

〔2〕 胡适宜，1982：被子植物胚胎学，高等教育出版社出版，pp:30—36.

〔3〕 Dickinson, H. G., and J. Heslop-Harrison, 1968: *Nature*, **220**: 926—927.

〔4〕 Dickinson, H. G., and P. R. Bell, 1976 a: *Ann. Bot.*, **40** (165):103—113.

〔5〕 Dickinson, H. G., and P. R. Bell, 1976 b: *Ann. Bot.*, **40** (169):1101—1109.

〔6〕 Heslop-Harrison, J., 1968: *Science*, **161**:230—237.

〔7〕 Kapil, R. N., and S. C. Tiwari, 1978:*Int. Rev. Cytol.*, **53**:291—331.

〔8〕 Rohr, R., 1977: *Cytologia*, **42**:157—167.

〔9〕 Vasil, I. K., and H. Aldrich, 1970: *Protoplasma*, **71**: 1—37.

〔10〕 Whelan, E. D. P., 1974: *Can. J. Bot.*, **53**:1219—1224.

〔11〕 Willemse, M., 1971: *Act. Bot. Neer.*, **20**:611—623.

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF MICROSPOROGENESIS IN PINUS YUNNANENSIS

Liu Chengyun, Li Song, Xu Weiming and Li Ming

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica)

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences)

Abstract The contraction of the protoplasts during the early development of the microsporangium is observed and the callose wall is formed at the same time. The microspor mother cells are separated from each other and were surrounded by callose wall before meiosis. The small pore about 0.2 to 0.3 micron in diameter within the callose wall was observed. After the tetrad was formed, the nuclear envelope and the golgi bodies show a particular activity which is probably related to the exine depositing. This phenomenon occurs in the early tetrad stage. The formation of the intine takes place during the free spore period. At first the nuclear envelope and the golgi bodies still show activity, but the decrease of activity follows. The endoplasm reticulum and mitochondrion increase. A lot of vesicula from endoplasm reticulum were discharged into the intine through the plasmolemma. The sporopollenin belt was observed between the Ubisch body and exine of pollen.

Key words *Pinus yunnanensis*; Ultrastructure; Microsporogenesis

EXPLANATION OF PLATES

p-plastid; D-dictyosome; W-wall; N-nucleus; ER-endoplasm reticulum; M-mitochondrion; V-vacuole; Sp-spindle; C-callose wall; T-tapetum; S-saccus; U-Ubisch body.

Plate I 1. The initial microspore mother cell, showing plasmodesma, a lot of dictyosomes and plastids free form starch; 2. Microspore mother cell before meiosis, showing the large nucleus contracted protoplasts (arrows) starch containing plastid, small vacule and mitochondria; 3. The microspore mother cell at the metaphase I of meiosis, showing surrounding callose wall and small pore (arrow). The spindle and chromosome in the middle of the cytoplast and a lot of vesicula around them; 4. Enlarged parts Fig. 3. showing a lot of vesicula secreted by dictyosome.

Plate II 5. Tetrad, showing the nuclear envelope highly distorted (arrows). The cisterra highly expansion and initial exine or saccus (star); 6. Enlarged parts Fig. 5. showing distorted and expensile nuclear envelope (arrows). The inner exine links up with the plasmolemma and secretory vesicula, but the outer exine links up with callose wall; 7 Showing canal which link up exine and callose wall; 8. As 7. showing primary saccus and the tapetal wall begin disintegration at the same time; 9. The sexine (including saccus) and nexine of the microspore have been all formed at the tetrad period.

Plate III 10. Free microspore period, the material that is discharged by tapetum deposited upon the exine. The nuclear envelope and dictyosome are still active; 11. The saccus is formed, and the dictyosome decreases, and the nuclear envelope is still in activity (arrows) ; 12. The intine forming stage showing the endoplasm reticum stack; 13. In the latter stage of intine formation the normal nuclear envelope was resumed. A lot of vesicula from endoplasm reticulum into the intine through the plasmolemma and many mitochondria are shown too; 14. The tapetum disintegrated and the Ubisch bodies released into the loculus; 15. Showing the sporopollenin belt between the Ubisch body and exine of pollen.